

Реконструкция пространственной структуры фицина

В.А. Королева^{1,2}, E-mail: koroleva_victoria@bk.ru
М.С. Кондратьев^{1,3}, М.Г. Холявка¹, В.Г. Артюхов¹

¹ Воронежский государственный университет

² Воронежский государственный медицинский университет

³ Институт биофизики клетки РАН

Аннотация. Методами высокопроизводительного компьютерного моделирования выполнена реконструкция пространственной структуры фицина (КФ 3.4.22.3) из *Pisum sativum* (GenBank: AAB41816.1). Приведена детализация методики получения модели, которая может быть использована как в научных, так и в образовательных целях.

Ключевые слова: фицин, реконструкция, гомология, банк белковых структур

Введение

Цистеиновые протеазы широко используют в пищевой промышленности (пивоварение, хлебопекарное дело, изготовление мясных и рыбных продуктов), химической промышленности (синтез пептидов и аминокислот, в качестве активного вещества многих детергентов), в фармацевтической промышленности и медицине (антигельминтные агенты, в качестве противовоспалительных веществ, как альтернатива антибиотикам) [1].

Цистеиновые протеазы включают десять кланов: CA, CD, CE, CF, CH, CL, CM, CN, CO и C-. Большая часть растительных тиоловых протеолитических ферментов относится к семейству C1 (клан CA). Протеазы семейства C1 синтезируются с сигнальным пептидом, который обеспечивает их доставку к конкретным клеточным компартментам, и пропептидом, который в дальнейшем отщепляется для активации фермента. Глобула этих протеаз содержит совокупности α -спиралей (R-домен) и β -складчатостей (L-домен), разделенных канавкой, содержащей активный центр, образованный остатками Cys-25 и His-159, которые расположены на разных сторонах канавки и обнаруживаются у всех членов семейства C1. Другими остатками, важными для катализа, являются Gln-19, который, как полагают, помогает в образовании оксианионного канала и Asn-175, который ориентирует имидазольное кольцо His-159 [2].

Цистеиновые протеазы в основном получают из тропических растений родов *Carica* (папайн, химопапайн, карикаин), *Ficus* (фицин), *Ananas* (бромелин, ананаин и др.). Данные тиоловые протеазы весьма популярны благодаря своим свойствам: высокая субстратная специфичность, широкие диапазоны pH (от 5.0 до 8.0) и температуры (оптимумы функционирования ферментов лежат в пределах от 40 до 70 °C). Молекулярная масса большинства тиоловых протеаз составляет 25-30 кДа [1].

В 2011 году Azarkan с соавторами представили данные о вторичной структуре молекулы фицина С, которая содержит 24 ± 4 % α -спиралей, 22 ± 4 % β -слоев, 18 ± 2 % поворотов цепей и 36 ± 3 % неупорядоченных участков. Эти значения близки к показателям вторичной структуры папаина [3].

Так как фицин активно используется в пищевой промышленности, обладает потенциальными свойствами для эффективного применения в медицине и фармакологии, необходимо более глубокое изучение структуры молекулы фермента. Знания о третичной структуре энзима помогут понять и предсказать поведение биокатализатора в условиях различного микроокружения [4].

Для получения структуры белка с неизвестной пространственной организацией существует ряд способов, основанных на компьютерном моделировании. В первую очередь, например, сворачивание полипептидной цепи в структуру с минимумом энергии (из разветвленной конформации) посредством расчета траектории молекулярной динамики или расчетов по методу Монте-Карло. Несколько позже появились распределенные вычислительные сети, знаменитые Folding@home и Rosetta@home.

Вторым широко-используемым подходом к получению третичных структур белков является моделирование укладки полипептидной цепи *de novo* (иногда говорят *ab initio*), т.е. по анализу «текста» аминокислотной последовательности. Для каждого остатка известна тенденция быть в составе того или иного типа вторичной структуры. Опираясь этими данными, современные алгоритмы предсказывают содержание α -спиралей, β -слоев и неупорядоченных участков.

Третий распространенный подход – это моделирование на основании гомологии, который был использован в данной работе. Подбор и анализ близких по аминокислотной последовательности белков, для которых пространственная структура уже экспериментально установлена и депонирована в Protein Data Bank, позволяет с высокой степенью достоверности предсказать третичную структуру белка.

Процесс моделирования по гомологии включает несколько шагов, главными из которых являются поиск структурного шаблона и построение диаграммы аминокислотного выравнивания. Решающим фактором, определяющим качество получаемых моделей, является степень гомологии (или идентичности) последовательностей моделируемого белка и шаблона (лучше если >30%).

Целью работы была реконструкция пространственной структуры фицина (КФ 3.4.22.3) из *Pisum sativum* (GenBank: AAB41816.1) на основе структуры молекулы papain из *Carica papaya* (PDB-ID: 9PAP).

1. Изучение пространственной структуры фицина

Поиск гомологов фицина (КФ 3.4.22.3) из *Pisum sativum* (GenBank: AAB41816.1) производился с помощью серверов FASTA и PSI-BLAST в базе структур белков PDB. Далее осуществлялось множественное выравнивание с помощью сервера CLUSTALW. Расчеты и визуализацию выравнивания выполняли в биоинформатическом пакете UGENE 1.25. Для финальной процедуры создания и верификации модели, построенной по сиквенсу изучаемого белка и PDB-каркасу гомолога, был использован пакет Phyre2.

Основой для реконструкции пространственной структуры белка фицина послужил его сиквенс (GenBank: AAB41816.1), а также сиквенс и координаты атомов близкого гомолога – папаина (PDB-ID: 9PAP). Результаты множественного выравнивания этих протеаз приведены на рис. 1.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

9PAP ----- 0
Pisum_sativum MASILYSLILFGLITLSLSLDMSSGRSNKEVMTMYEKWLVKHQKVYVGLGEKNQRFQIFK 60

9PAP ----- 0
Pisum_sativum DNILIFIDEHNAPNHSHYRVGLNEFSDITNKEVYRDTYLSRNISNINIKNKITSVRYAYKAGHN 120

9PAP --IPEYVDWRQKGAVTPVKNNQGS CGSCHAFA SAVVTIEGIIKIRTGNLNLNQSEQLLDCCR 58
Pisum_sativum NKL PVSVDWR--GALTPIKNQGSCGACUAFSAVAAVEAINKIVTGSLSVLS EQELVDCCR 178
          :*  ***  **:*:*****:*****:;:;* ** *:*  *  ****:*

9PAP R-SYGCNGGYPWSALQLVA-QYGIHYRNTYPYEGVQRVCRSREKGPYAAKTDGVRQVQPY 116
Pisum_sativum TKNKGCNGGNQVNAVRFITVENGLDSQIDYPYLRGQSTCNQAQKNTKVVSINGYKNVQRN 238
          . ****  . * :;:: : * : : **** * * : . : * . . . : * : ;**

9PAP NQGALLYSIANQPVSVVLQAAGKDFQLYRGGIFVGPCCGNKVDHAVA AVGYGP---MYIL 172
Pisum_sativum SESALMEAVANQPVS VGEAYGKDFQLYQSGVFTGSCGTSLDHAWVWVGYSGENGKYHL 298
          . : * : ; : ***** : ; * ***** : ; * * * . . . . ***** : ; *

9PAP IKNSWGTGWGNGYIRIKRGTGN-SYGVCGLYTSSFYPPVKN----- 212
Pisum_sativum VKNSWGTNWGERGYLKIERNLKNNTNGKCGIAMDATYPTKLRNRESEVTNSGVEKLQMLVP 358
          : ***** ** * : : * : * . * * * : . : * * *

9PAP ----- 212
Pisum_sativum VLETPTNVA 367

```

Рис. 1. Результаты множественного выравнивания фицина и папаина

Говоря об особенностях пространственной структуры папаина следует отметить, что этот фермент имеет укладку цепи, типичную для тиоловых протеаз. Трехмерная структура молекулы папаина была одной из первых установленных белковых структур. Было показано, что полипептидная цепь свернута в два домена примерно одинакового размера, но совершенно разной конформации.

После обработки исходных данных полученная структура была оптимизирована, отрелаксирована в силовом поле AMBER96 в течение 100 пикосекунд.

Нами было выявлено, что воссозданная модель фицина имеет на поверхности глобулы особый «карман», в котором и находятся предпочтительные места связывания крупных лигандов, тогда как мелкие агенты для шивок связываются без четкой локализации, оказываясь разбросанными по глобуле фермента (рис. 2).



Рис. 2. Фицин [реконструкт из *Pisum*]. Активный центр CYS145 обозначен стрелкой

Заключение

Выполнена реконструкция пространственной полноатомной структуры промышленно значимого для получения фармацевтических препаратов фицина (КФ 3.4.22.3) из *Pisum sativum* (GenBank: AAB41816.1). Приведена детализация методики получения модели, которая может быть использована как в научных, так и в образовательных целях.

Литература

1. Feijoo-Siota, L., Villa, T. G. / Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications / L. Feijoo-Siota, T. G. Villa // Food Bioprocess Technol. – 2011. – Vol.4. –P.1066-1088.
2. Drenth, J. Structure of papain / J. Drenth [et al.] // Nature. – 1968. – Vol.218. – P. 929-932.
3. Azarkan, M. / Selective and reversible thiol-pegylation, an effective approach for purification and characterization of five fully active ficin (iso)forms from *Ficus carica* latex / M. Azarkan [et al.] // Phytochemistry. – 2011. – Vol. 72. – P. 1718-1731.

4. Baidamshina, D. R. / Targeting microbial biofilms using Ficin, a nonspecific plant protease roof / D. R. Baidamshina [et al.] // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – P. 46068.